

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09322773 A

(43) Date of publication of application: 16 . 12 . 97

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
C12N 9/90
/(C12N 1/21 , C12R 1:19), (C12N 9/90 , C12R 1:19)

(21) Application number: 08142748

(71) Applicant: OSAKA BIO SCI KENKYUSHO

(22) Date of filing: 05 . 06 . 96

(72) Inventor: URADE YOSHIHIRO
KANEOKA YOSHIHIDE

(54) DNA CAPABLE OF CODING HEMATOPOIETIC ORGAN TYPE PROSTAGLANDIN D SYNTHASE OF MAMMAL

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new DNA capable of coding a hematopoietic organ type prostaglandin D synthase of a mammal and providing an enzyme useful for the elucidation of a mechanism for producing prostaglandin D₂, development of a therapeutic agent for allergic diseases due to enzyme inhibition, diagnosis, etc., of leukemia.

SOLUTION: This new DNA is capable of coding a hematopoietic organ type prostaglandin D synthase of a mammal (e.g. a human) having an amino acid sequence represented by the formula and used for the production, etc., of the prostaglandin D synthase useful for the elucidation of a mechanism for producing prostaglandin D₂, development of a therapeutic agent for allergic diseases and mastocytosis concerned with the prostaglandin D₂, diagnosis, etc., of mastocytoma and leukemia. The DNA is obtained by screening a chromosomal gene library derived from the human liver with a rat hematopoietic organ type prostaglandin D synthase cDNA as a probe and recovering the DNA from a positive clone.

1	GAATTGCCACATGCCAAACCTACAACTCACCTATTAAATGACGGGGAGAGCGAGAAAT	43
2	X F X P X Y X T C T T V V N R G A K A L	
61	TATTTGTTACATTTGCTTATTCGCAATACAACTATLAACACCAAGAATAAGACAGCG	120
62	I R Y I F A T L D P I O Y E D H R I E O A	37
121	AGACTGGGCTGAAATCAAAATCAGCTCCGATTTGCAAAAATCCGATTCTGGAGTGA	180
122	C W P F E T E S T L P F G X I F L E Y D	37
	;	
	;	
	;	
482	TACCAACATTCTGCTTTAGCTGCGCTCTTAGACAAACATCCAGGCTCTGCGCTT	540
483	F T L L V F R P D L L D V H P R E V T L	177
541	ACGGAAGAAAGGCCAAGCCATCTGGCGTGGCTTAACTGGATAAAGGGAGGCCAAC	600
542	R X X Y Q A S F A V A N H I X R R P Q T	197
591	CAAACTCTAGCAGTCATGCTGCGCTCTAGCTTCTTCCTGGGGCATCTCTCAAT	660
592	K L	199

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-322773

(43)公開日 平成9年(1997)12月16日

(51)Int.Cl. ⁶ C 12 N 15/09 C 07 H 21/04 C 12 N 1/21 9/90 // (C 12 N 1/21	識別記号 Z NA	序内整理番号 9282-4B	F 1 C 12 N 15/00 C 07 H 21/04 C 12 N 1/21 9/90	技術表示箇所 Z NAA B
--	--------------	-------------------	--	----------------------

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 23 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-142748

(71)出願人 390000745

財団法人大阪バイオサイエンス研究所
大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

(22)出願日 平成8年(1996)6月5日

(72)発明者 裏出 良博
京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下る古
西町440 藤和シティコーポ706号

(72)発明者 金岡 裕秀
大阪府茨木市北春日丘4-9-24 井上ハ
イツ102号

(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外1名)

(54)【発明の名称】 哺乳動物の造血器型プロスタグラジンD合成酵素をコードするDNA

(57)【要約】

【課題】 哺乳動物の造血器型プロスタグラジンD合成酵素をコードするDNAのクローニング。

【解決手段】 哺乳動物の造血器型プロスタグラジンD合成酵素をコードするcDNAをラット、マウス、ヒトよりクローニングし、得られたヒト造血器型プロスタグラジンD合成酵素cDNAを含有する発現プラスミド(pT7-7hHPGDS)で大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。得られた形質転換体は菌体内に極めて多量の造血器型プロスタグラジンD合成酵素を発現した。またその発現蛋白質は試験管内で酵素活性を示し、極めて効率的にプロスタグラジンII₁をプロスタグラジンD₂に変換した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物の造血器型プロスタグランジンD合成酵素をコードするDNA。

【請求項2】 哺乳動物がラットである請求項1のDNA A。

【請求項3】 哺乳動物がマウスである請求項1のDNA A。

【請求項4】 哺乳動物がヒトである請求項1のDNA A。

【請求項5】 ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素が図1記載のアミノ酸配列によって示されるものである請求項4のDNA。

【請求項6】 請求項4のDNAを含有する発現ベクター。

【請求項7】 ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素を発現する、請求項6の発現ベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項8】 図1記載のアミノ酸配列によって示されるヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、哺乳動物のプロスタグランジンH群をプロスタグランジンD群に変換する造血器型プロスタグランジンD合成酵素(以下「プロスタグランジンD合成酵素をPGD合成酵素またはPGDSと称する」)をコートするDNA、該DNAをコートする発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された形質転換体、及び該形質転換体によって発現される哺乳動物の造血器型PGD合成酵素に関する。

【0002】

【従来の技術】代表的なプロスタグランジンDであるプロスタグランジンD₂は、各種の刺激により生体膜から遊離するアラキドン酸から動物組織で合成される生理活性物質であり、プロスタグランジンH₂(シクロオキシゲナーゼによって生産されるプロスタグランジン類の共通の前駆体)からPGD合成酵素によって生産される。

【0003】 PGD合成酵素には、グルタチオン依存型の造血器型PGD合成酵素(Christ Hazelhof and Nugteren, *Biochim. Biophys. Acta*, 572, 43-51 (1979)、Urade et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 3820-3825 (1977) 及びグルタチオン非依存型の脳型PGD合成酵素(Shimizu et al., *J. Biol. Chem.*, 254, 5222-5228 (1979)、Urade et al., *J. Biol. Chem.*, 260, 12410-12415 (1985))の二種類が存在することが知られている。

(Urade et al., *J. Lipid Mediators Cell Signallin* g, 12, 257-273 (1995))。ラットを用いた研究から、前者は、脾臓、骨髄、消化器、胸腺又は皮膚などのほぼ全身の末梢臓器に幅広く存在することが知られており(Ujihara et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 260, 521-531 (1988)) (Ujihara et al., *J. Invest. Dermatol.*,

90, 448-451 (1988))、後者は、脳、副腎丸、脊髄、網膜又は内耳などの主として中枢神経系を中心に分布することが知られている(Urade et al., *J. Biol. Chem.*, 260, 12410-12415 (1985)、Ueno et al., *J. Neurochem.*, 45, 483-489 (1985)、Urade et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 3820-3825 (1987)、Goh et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 921, 302-311 (1987)、Tachibana et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7677-7680 (1987))。

【0004】本発明者らは、ラット造血器型PGD合成酵素に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色により、造血器型PGD合成酵素は組織球、樹状細胞、肥満細胞、皮膚のランゲルハンス細胞、肝臓クッパー細胞などの免疫・アレルギーの担当細胞に局在することを見いだした(Ujihara et al., *J. Invest. Dermatol.*, 90, 448-451 (1988)、Urade et al., *J. Immunol.*, 143, 2982-2989 (1989)、Urade et al., *J. Biol. Chem.*, 265, 371-375 (1990)、Miwa et al., *Anal. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 100, 665-667 (1991))。

【0005】そのラットにおける組織分布および細胞局在性から、造血器型PGD合成酵素は免疫反応あるいはアレルギー反応に関与することが予想される。さらに本発明者らは最近の研究で、マウス骨髄由来肥満細胞をc-fms(神経伝子のアレル)リサイド存在下で培養するとプロスタグランジンD₂の産生亢進と造血器型PGD合成酵素の蛋白質レベルの発現誘導が起きることを見いだし(Murakami et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 3239-3246 (1995))、プロスタグランジンD₂および造血器型PGD合成酵素が肥満細胞の分化や成熟に関与することを示した。

【0006】一方、ヒトの肥満細胞增多症の患者において観察される下痢、貧脈、呼吸困難、昏睡等の症状は、肥満細胞から放出される多量のプロスタグランジンD₂によって引き起こされることが報告され(Roberts et al., *New Engl. J. Med.*, 303, 1400-1404 (1980))、ヒトの各種疾患においても、プロスタグランジンD₂が関与する可能性が指摘されている。

【0007】プロスタグランジンD₂はさらに酵素的あるいは非酵素的反応により、9 α , 11 β -プロスタグランジンF₂やプロスタグランジンJ₂に変化する。これらのプロスタグランジンは、他のプロスタグランジンとは異なる生理作用を示す。特に、プロスタグランジンJ₂およびその類似体は癌細胞の増殖阻害活性を示したり、肥満の原因である脂肪細胞の分化の指標として研究されている、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor(ペルオキソソーム増殖剤活性化レセプター)の内因性リガンドとして同定され(Kliewer et al., *Cell*, 83, 813-819 (1985))、(Barry et al., *Cell*, 83, 803-812 (1985))注目をあびている。

【0008】しかし、免疫、アレルギー、肥満などの生

体反応において、プロスタグランジンD₂およびその代謝産物である9α, 11β-プロスタグランシンF₂、プロスタグランジンJ₂さらに、△¹²-プロスタグランシンJ₂、などのJ₂類似体がいかなる役割をもつのか、これらのプロスタグランシン類の合成を決定する造血器型PGD合成酵素がいかなる役割をもつのか、また一般に、生成量や反応性の動物種差の大きいことが知られているプロスタグランジンの中でも、プロスタグランジンD₂の合成酵素の組織分布および細胞局在がどの程度の動物種差を示すのか、あるいはその遺伝子発現調節がどのように行われるかなどの問題に関する答えは得られていない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、ラットの造血器型PGD合成酵素cDNAのクローニングに成功し、そのヌクレオチド配列を決定し、該酵素のアミノ酸配列を決定した。さらに本発明者らはラットのヌクレオチド配列に基づいて、マウスおよびヒトの造血器型PGD合成酵素cDNAのヌクレオチド配列を決定し、該酵素のアミノ酸配列を決定した。

【0010】即ち、本発明者らは、ヒト、ラット、マウス全ての造血器型PGD合成酵素cDNAのクローニングに成功し、そのヌクレオチド配列を決定し、該酵素のアミノ酸配列を決定した。これにより造血器型PGD合成酵素を特異的に認識する抗体の作成、および該酵素を用い、その阻害剤をスクリーニングする道が開けた。また、造血器型PGD合成酵素の遺伝子発現機構を調べることにより、末梢でのプロスタグランジンD₂の役割を理解する研究が可能となった。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは種々のヒト組織を造血器型PGD合成酵素の発現に関してスクリーニングして、ヒト胎盤が他の組織の約50倍の造血器型PGD合成酵素を発現することを見い出した。次いで、ヒト胎盤のRNAを用い、造血器型PGD合成酵素をコードするcDNAの単離とクローニングに成功した。得られた1.9kbのcDNAクローニング(phHPGDS1)のヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を図1に示す。

【0012】上記のcDNAは199アミノ酸からなるタンパク質をコードすることができるオーフンリーディングフレームを有する。推定のアミノ酸配列から、造血器型PGD合成酵素は199アミノ酸からなるタンパク質であり、その配列は同時にクローニングされたマウスおよびラットの造血器型PGD合成酵素の配列と高い相同意を示す。後述するように、造血器型PGD合成酵素のアミノ酸配列を他のタンパク質のアミノ酸配列と比較し、該タンパク質はグルタチオニン転移酵素ファミリーに属することが確認された。

【0013】本発明のヒト造血器型PGD合成酵素をコ

ートするcDNAをT7ポリメラーゼ遺伝子のプロモーターのコントロール下に含有する発現プラスミド(pT7-7hHPGDS)を構築し、該プラスミドで大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。形質転換体をIP-TG(イソプロピルチオ-β-D-ガラクトノト)存在下に培養した結果、その菌体内に多量のヒト造血器型PGD合成酵素を発現することが示された。

【0014】すなわち、本発明はヒト造血器型PGD合成酵素をコードするDNA、該DNAを担持する発現ベクター、該ベクターによって形質転換された形質転換体、およびかかる形質転換体によって生産されるヒト造血器型PGD合成酵素を提供するものである。

【0015】発現プラスミドpT7-7hHPGDSで形質転換された大腸菌pYK1は受託番号、FERM BP-5489の下、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。(受託日:平成8年3月27日)。

【0016】本発明のヒト造血器型PGD合成酵素をコードするcDNAのクローニングは以下に述べる方法により行った。成熟ラット脾臓の細胞質画分により造血器型PGD合成酵素を精製し(Urade et al., (1987)前掲)、精製酵素をリソルベントペプチダーゼによって分解して得たペプチド断片のアミノ酸配列を決定した。

【0017】精製酵素のN末端アミノ酸配列(Urade et al., (1989)前掲)、及び得られたペプチド断片のアミノ酸配列より推測されるDNAプライマーを合成し、ラット脾臓mRNAを鉄型とするRT-PCRを行った結果、134bpのcDNA断片が増幅され、そのヌクレオチド配列はラット脾臓より精製した造血器型PGD合成酵素の部分アミノ酸配列をコードしていた。134bpのcDNA断片のヌクレオチド配列とそれがコードするアミノ酸配列を図2に示す。増幅されたcDNAのヌクレオチド配列に基き遺伝子特異的プライマーを合成し、5'-RACE(Rapid Amplification of cDNA ends)法、3'-RACE法により完全長(1kb)のラット造血器型PGD合成酵素cDNAを単離した。このcDNAのヌクレオチド配列を図3に示す。

【0018】ラット造血器型PGD合成酵素cDNAは199アミノ酸をコードし得る597ヌクレオチドのオーフンリーディングフレームを有する。推定のアミノ酸配列は、上記の方法で決定したラット脾臓より回収した精製酵素の部分アミノ酸配列と一致を示していた。そのアミノ酸配列を他のタンパク質のアミノ酸配列と比較すると、グルタチオニン転移酵素のアミノ酸配列と20~40%の相同意を示し、該タンパク質はグルタチオニン転移酵素遺伝子ファミリーに属することが判明した(図8)。また、その遺伝子系統樹から、該タンパク質はこの遺伝子ファミリーの全く新たな構成員であることが確認された(図9)。

50 【0019】ヒトの各種臓器から調製した全RNAを用

いて、ラット造血器型PGD合成酵素cDNAをプローブとするノーザンハイブリダイゼーションを行い、ヒト胎盤が他の組織の約50倍の造血器型PGD合成酵素mRNAを発現することを見い出した。同時に、ヒト染色体遺伝子ライブラリーをラット造血器型PGD合成酵素cDNAをプローブとしてスクリーニングし、ヒト造血器型PGD合成酵素の染色体遺伝子断片を含むクローニングを単離し、そのマクロオリオチド配列を決定してエクソン部分の配列から遺伝子特異的プライマーを合成した。さらに、ヒト胎盤から全RNAを調製し、遺伝子特異的プライマーを用いた5'-RACE法、3'-RACE法を行い、完全長(1kb)のヒト造血器型PGD合成酵素cDNAを単離した(図1)。

【0020】その配列は同時にクローニングされたマウスおよびラットの造血器型PGD合成酵素の配列と高い相同性を示した(図7)。

【0021】得られたヒト造血器型PGD合成酵素cDNAをT7ポリメラーゼ遺伝子のプロモーターのコントロール下に含有する発現プラスミド(pT7-7h11PGDS)を構築し、該プラスミドで大腸菌BL21(D.E3)を形質転換した。形質転換体をIPTGの存在下に培養した結果、その菌体内に多量のヒト造血器型PGD合成酵素が発現された。その発現蛋白質は試験管内でPGD合成酵素活性を示し、その酵素学的性質は本発明者らが示したラット脾臓の細胞質画分より精製した造血器型PGD合成酵素の性質(Urade et al., (1987)前掲)とよく一致した。

【0022】本発明によりヒト造血器型PGD合成酵素をコードするcDNAがクローニングされ、そのマクロオリオチド配列が明らかになったので、適当な宿主細内で組換えヒト造血器型PGD合成酵素を発現する発現ベクターを構築することができる。得られた発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、この形質転換体をヒト造血器型PGD合成酵素をコートするDNAの発現に適した条件下で培養することにより、組換えヒト造血器型PGD合成酵素を製造することができる。このようにして得られた組換えヒト造血器型PGD合成酵素は、造血器型PGD合成酵素に特異的に結合する抗体の調製、あるいは、その阻害剤のスクリーニングに用いられ、プロトタイプランジンID₂の生理作用関係の究明等の研究および臨床面で有用である。

【0023】本発明のヒト造血器型PGD合成酵素をコートするcDNAのマクロオリオチド配列は図1に記載されているが、当業者ならば、該DNAから、マクロオリオチドの挿入、置換、または欠失により、天然のヒト造血器型PGD合成酵素と同様の機能を有する誘導体を導くことができるということを理解するであろう。従って、そのようにして導かれるDNA誘導体およびそれによってコードされるヒト造血器型PGD合成酵素誘導体も本発明の範囲に包含されるものである。

【0024】本発明のヒト造血器型PGD合成酵素をコートするDNAを含有する発現ベクターは当業者既知の方法で構築することができる。ヒト造血器型PGD合成酵素DNAの発現に適したベクターは、該DNAの挿入部位の直下流に転写開始のためのプロモーターを有するものであらう。適当なプロモーターも当該技術分野で既知であり、宿主細胞内の機能特性に応じて選択することができる。例えば、SV40ウイルス初期遺伝子のプロモーター、ペガチト鎖延長因子EF-1 α のプロモーター、マクロオリオチド遺伝子のプロモーター、 β -アクチンのプロモーター、CMVウイルスのプロモーター等を動物細胞系での発現で、T7ポリメラーゼのプロモーター等を細菌、大腸菌での発現に用いることができる。ヒト造血器型PGD合成酵素DNAの挿入部位下流には転写終結シグナルがあることが望ましい。

【0025】ベクター中にはたとえば薬物耐性マーカーのような選択可能マーカーが存在することが望ましい。あるいは、ヒト造血器型PGD合成酵素を含有する発現ベクターと別個の抗生物質等の薬物耐性をコードするプラスミドを用いて同時に形質転換してもよい。

【0026】発現ベクターを構築するには本発明のヒト造血器型PGD合成酵素をコートするDNAを適当なベクターに挿入する。適当なベクターは、プロモーター、転写終結シグナル、選択マーカーその他の条件を考慮し、当該技術分野で既知のものから選択する。本発明のcDNAを挿入し、培養細胞に導入してこのcDNAを発現する目的に用いることができるDNAベクターとして、例えば動物細胞での発現においてはpKCR、pEF-BOS、CDM8、pCEV4ウシバビローマウイルスDNAなど、大腸菌においてはpGEMEX、pUC等を挙げることができる。

【0027】本発明のヒト造血器型PGD合成酵素の発現に用い得る細胞は複製可能で図1記載のDNAを発現し得るものであればよい。例えば、大腸菌のような原核性微生物、S.セレビコエのような真核性微生物、さらには哺乳類細胞が用いられる。組織培養細胞にはトリ、または哺乳類細胞、例えばネズミ、ラットおよびサル細胞が含まれる。適当な宿主細胞ベクターシステムの選択および使用方法等は、当業者に既知であり、それらの内から本発明の造血器型PGD合成酵素をコードするcDNAの発現に適した系を任意に選択することができる。

【0028】

【発明の実施の形態】以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【実施例】

実施例1 ヒト造血器型PGD合成酵素をコードするcDNAのクローニング

7
(1) ラット造血器型PGD合成酵素cDNAのクローニング

既述の方法 (Urade et al., (1987) 前掲) によりラット脾臓の細胞質画分により造血器型PGD合成酵素を精製した。300 μgの精製酵素を3 μgのリシルエンドペプチダーゼ (和光純業) によって分解 (0.1M Tris HC1 (pH 9) 中、37°C、終夜) し、得られたペプチド断片を逆相HPLC (Toso社製、TSKgel ODS-80Ts カラム、4.6x250mm) で分離 (0.05% TFA (トリフルオロ酢酸) の存在下、アセトニトリル/グリジエントにて溶出) してそのアミノ酸配列を決定 (model 477A, Applied Biosystems社) した。このアミノ酸配列 (配列番号3) を以下に記す。

Ile-Lys-Pro-Thr-Leu-Pro-Phe-Gly-Lys

【0029】精製酵素のN末端アミノ酸配列 (Urade et al., (1989) 前掲)、及び得られたペプチド断片のアミノ酸配列より推測されるDNAプライマーを合成した (Beckman社製、Oligo1000使用)。このPCR用の2個のプライマーのヌクレオチド配列 (配列番号4および5) を以下に記す。

5' - C T I C T I T A C T T C A A Y A T G M G I G
G I A G I G C I G A A A T - 3'

(YはCあるいはTを示す。MはAあるいはGを示す。)

5' - T T I C C R A A I G G I A R I G T I G G T T
T - 3'

(RはAあるいはGを示す。)

【0030】ゲアニシンチオシアネート、酸フェノール法 (Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987)) により、ラット脾臓より全RNAを調製し、oligo(dT)・セルロースカラムクロマトグラフィーを用いてpoly(A)・RNAを選択した。上記プライマーを用いてラット脾臓mRNAを錆型とするRT (逆転写) - PCRを行った。RT-PCRは、AMV逆転写酵素 (Takara社製) とPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene社製) を用い、PCR条件 94°Cで30秒間、45°Cで30秒間、72°Cで1分間を1サイクルとしてこれを30サイクル行った (Perkin-Elmer社製、Gene Amp PCR System 2400を使用)。

【0031】その結果134bpのcDNA断片が増幅され、そのヌクレオチド配列はラット脾臓より精製した造血器型PGD合成酵素の部分アミノ酸配列をコードしていた。そのヌクレオチド配列 (配列番号6) および予想アミノ酸配列 (配列番号7) を図2に記す。

【0032】増幅されたcDNAのヌクレオチド配列に基づき遺伝子特異的プライマーを合成し、5' - RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法、3' - RACE法により完全長 (1kb) のラット造血器型PGD合成酵素cDNAを単離した (Clontech社製、Marathon cDNA Amplification Kitを使用)。

cDNA Amplification Kitを使用)。遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列 (配列番号8および9) を以下に記す。

5' - RACE用プライマー

5' - T A G G C C A G T C A G C T T G T T C T A T
- 3'

3' - RACE用プライマー

5' - A T A G A A C A A G C T G A C T G G C C T A
- 3'

10 得られた完全長cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号10) およびその予想アミノ酸配列 (配列番号11) を図3に記す。

【0033】同様にしてマウス卵管mRNAを錆型として遺伝子特異的プライマー (配列番号8および9) を用いた、5' - RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法、3' - RACE法により完全長 (1kb) のマウス造血器型PGD合成酵素cDNAを単離した (Clontech社製、Marathon cDNA Amplification Kitを使用)。得られたマウス完全長cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号23) およびその予想アミノ酸配列 (配列番号16) を図11に示す。

【0034】(2) ヒト造血器型PGD合成酵素染色体遺伝子のクローニング

ヒト肝臓由来染色体遺伝子ライブラリー (Clontech社) を (1) で製造したラット造血器型PGD合成酵素cDNAをプローブとしてスクリーニング (ブラークハイブリダイゼーション法) し、ヒト染色体遺伝子断片を含むクローニングを単離した。得られたクローニングのヌクレオチド配列を決定してラット造血器型PGD合成酵素cDNAのヌクレオチド配列と比較し、エクソン部分を含む配列を同定した。

【0035】ラット造血器型PGD合成酵素cDNAのヌクレオチド配列とヒト造血器型PGD合成酵素染色体遺伝子のエクソンを含む部分のヌクレオチド配列 (配列番号12および13) の比較図を図4に記す。

【0036】(3) ヒト造血器型PGD合成酵素cDNAのクローニング

ヒト造血器型PGD合成酵素遺伝子のエクソン部分から以下に示す2つり遺伝子特異的プライマーを合成した。

40 両プライマーおよびヒトの胎盤から調製した全RNAを用いて5' - RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法、3' - RACE法により完全長 (1kb) のヒト造血器型PGD合成酵素cDNAを単離した (Clontech社製、Marathon cDNA Amplification Kitを使用)。遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド配列 (配列番号14および15) を以下に記す。

5' - RACE用プライマー

5' - G A A T T G C A C C A T G C C A A A C T -
3'

3' - RACE用プライマー

5' - A G T T T G G C A T G G T G C A A T T C -

3'

得られた完全長cDNAのヌクレオチド配列(配列番号1)およびその予想アミノ酸配列(配列番号2)を図1に記す。ヒト造血器型PGD合成酵素のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示した図1において、ヌクレオチド番号は上、アミノ酸番号は下に記されている。

【0037】このcDNAの解析により、以下の点が明らかになった。

- 1) cDNAは1kbからなり3'末端にボリ(A)付加シグナル(AATAAA)を有する。
- 2) 長いオープンリーディングフレーム(597ヌクレオチド)が存在する。このオープンリーディングフレームはヌクレオチド位置11~13の開始コドンから始まり608~610位のTAG終止コドンに至り、199アミノ酸からなるタンパク質をコードすることができる。
- 3) この蛋白N末端側にタイロシンキナーゼ(チロシンキナーゼ)によるリン酸化を受けるコンセンサス配列(図1下線)を有している。

【0038】実施例2 ヒト造血器型PGD合成酵素を発現する形質転換体の調製

(1) ヒト造血器型PGD合成酵素の大腸菌での発現
以上の様にして、実施例1で得られたヒト造血器型PGD合成酵素cDNAをT7ポリメラーゼ遺伝子のプロモーター(Tabor and Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1074-1078 (1985))のコントロール下に含有する発現プラスミド(pT7-7 hPGDS)を構築した。

【0039】塩基配列から推定されるアミノ酸配列のみが発現されるように制限酵素部位NdeIおよびEcoRIを、実施例1で得たヒト造血器型PGD合成酵素cDNAのそれぞれ5'末端側および3'末端側に導入した。導入はプラスミド(pT7 hPGDS)を鋳型として、以下のプライマーを用いたPCR法で行った。Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene社)を用い、PCR条件は94°Cで30秒間、65°Cで30秒間、72°Cで1分間を1サイクルとしてこれを20サイクル行った(Perkin-Elmer社製、Gene Amp PCR System 2400を使用)。用いたプライマーの塩基配列を以下に記す(配列番号2-1, 2-2)。

5' - NdeI プライマー

5' - T G C C A T A T G C C A A A C T A C A A A -

3'

3' - EcoRI プライマー

5' - T G G G A A T T C T A G A G T T G G T T T *

発現産物の量(ng)

プロスタグランдинII₁からプロスタグランдинD₂

への変換率 %

ラット

4.3

* G - 3'

【0040】pTHC8 (American Type Culture Collection 45127)を制限酵素BamHIで消化した(37°C、60分)後、Klenow DNAポリメラーゼ(Takara社)にて平滑末端とした(16°C、60分)。これに、EcoRI NotI BamHIアブリマー(Takara社)をT4DNAリカーゼ(Takara社)にて結合させたものを、制限酵素NdeIで消化し、アガロース電気泳動にて分離し、約2.5キロベースのDNA断片を回収した。この様にして得たベクターをpT7-7と命名した。

【0041】PCRで増幅されたDNA断片をNdeI、EcoRIで消化した後、T1DNAリガーゼ(Takara)にて、上で得たpT7-7ベクターに結合させた(16°C、30分)。以上の過程を図5に示す。

【0042】上で得た反応液を用い、大腸菌BL21(DE3)を変形塩化カルシウム法(Inoue et al., Gene 96, 23-28 (1990))により形質転換し、形質転換体、E. coli pYK1をLB培地(50μg/mlアンピシリンを含む)にて8~16時間培養した後、IPTG(終濃度0.4mM)を添加してさらに6時間培養した。発現の確認は菌体の可溶性蛋白質(培養後の菌体を遠心にて回収し、PBSに懸濁後、超音波破碎した(0 output level 5, 60 sec, W-385, Heat Systems-Ultrasonics, Inc.)を14%SDS-ポリアクリラミド電気泳動し、クマシーブルーカラム(染色を行った。その結果、菌体内にヒト造血器型PGD合成酵素が可溶性蛋白質として大量に発現された。PGD合成酵素活性の測定は、以下の様にして行った。

【0043】PGD合成酵素活性の測定

0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8)、1mMグルタチオンの条件下で、400μM [³H]-プロスタグランдинH₂(第一化学)と発現産物を含む試料を25°C、1分間インキュベートした。反応停止液(ジエチルエーテル:メタノール:1Mケン酸=30:1:1)を加えて、基質および酵素反応産物のプロスタグランдинD₂を有機溶媒層(エーテル層)に抽出し、薄層クロマトグラフィーにより展開(展開溶媒はジエチルエーテル:メタノール:酢酸=90:2:1)し、オートラジオグラフィーにかけた(BAS 2000, Fuji)。結果を表1に示す。酵素反応によって生じたプロスタグランдинD₂の放射能活性と全放射能活性からPGD合成酵素の活性を求めた。試料中の蛋白質濃度をLowry法(Lowry et al., J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951))により測定し、PGD合成酵素の比活性を計算した。

【0044】

【表1】

ラット

50

2.9

11
8.6
17.2
ヒト
2.46
4.92
9.84
24.6

表1から明らかな様に、容量依存的なプロスタグランジンH₂からプロスタグランジンD₂への変換が認められた。

【0045】(2)遺伝子組換え型ヒト造血器型PGD合成酵素の精製

IP TG存在下に培養した形質転換体の可溶性画分(培養後の菌体を遠心にて回収し、PBSに懸濁後、超音波破碎した(Output level 5, 60 sec, W-385, Heat Systems-Ultrasonics, Inc.)に含まれる遺伝子組換え型酵素を、10 mMケン酸緩衝液(pH 5)で平衡化したグルタチオンセファロース(ファルマシア社)に結合させ、同じ緩衝液で洗浄した後、10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 9)で溶出して回収した。最終的に100 mlの培養から約2 mgの遺伝子組換え型ヒト造血器型PGD合成酵素を得た。

【0046】上記酵素はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果、单一バンドを示し、その分子量は26,000であり、等電点は4.5であった(アミノ酸分析は行っていない)。形質転換体の可溶性画分と上記酵素のSDS電気泳動の結果を図6に示す。

【0047】(3)遺伝子組換え型ヒト造血器型PGD合成酵素の酵素学的解析

上で得た発現蛋白質は試験管内でPGD合成酵素活性を示した(表1)。遺伝子組換え型ヒト造血器型PGD合成酵素の精製標品の比活性(30.0 μmol/min/mg蛋白質)はラット脾臓より精製した酵素の比活性(32.5 μmol/min/mg蛋白質)と同等であった。

【0048】遺伝子組換え型酵素はグルタチオン要求性があり、ジチオスレイトールやメルカドヒドロール等の他のSH剤の存在下では活性はみられなかった。その酵素反応の至適pHは8であり、PGD合成反応の際に反応不活性を示した。遺伝子組換え型酵素はグルタチオン転移酵素活性も有するが、その比活性はこれまで同定されているグルタチオン転移酵素の10分の1以下である。

【0049】これらの酵素学的性質は本発明者らが示したラット脾臓の細胞質画分より精製した造血器型PGD合成酵素の性質(Urade et al., (1987)前掲)とよく一致する。

【0050】(4)造血器型PGD合成酵素の系統関係と進化学的解析

ヒト造血器型PGD合成酵素のメタオキチド配列およびアミノ酸配列は同時にクローニングされたマウスおよび

12
7.0
11.3
3.8
6.6
11.1
35.1

ラットの造血器型PGD合成酵素の配列と高い相同意を示す。そのアミノ酸配列(配列番号2, 11, 16)の

10 比較を図7に記す。

【0051】造血器型PGD合成酵素のアミノ酸配列を他のタンパク質のアミノ酸配列と比較した結果、該タンパク質はグルタチオン転移酵素ファミリーに属することが確認された。ヒト造血器型PGD合成酵素と他のグルタチオン転移酵素遺伝子ファミリーのメンバーのアミノ酸配列(配列番号2, 11, 16, 17, 18, 19, 20)の比較を図8に記す。

【0052】ヒト造血器型PGD合成酵素のアミノ酸配列と他のグルタチオン転移酵素遺伝子ファミリーのメンバーの配列との比較。相同意が多くなるようにギャップ(--)を導入した。

【0053】造血器型PGD合成酵素は、現在までに知られている哺乳動物のグルタチオン転移酵素とは約20~30%の相同意を有したが、イエバエより見出されたグルタチオン転移酵素と40%と最も高い相同意を示し、他に、線虫、回虫、イカのグルタチオン転移酵素とも高い相同意を有した。

【0054】アミノ酸配列のアライメントをもとにしてグルタチオン転移酵素遺伝子ファミリーの進化系統樹を作成した。その進化系統樹を図9に記す。

【0055】造血器型PGD合成酵素は、哺乳動物で今まで知られているグルタチオン転移酵素のクラスターとは離れた位置に存在し、むしろハエ、線虫、回虫、イカ、タコのグルタチオン転移酵素に近い、この遺伝子ファミリーの全く新たな構成員であることが確認された。

【0056】(5)ヒト造血器型PGD合成酵素mRNAの臓器分布

ヒト造血器型PGD合成酵素cDNAをプローブとしてヒトの臓器別遺伝子発現をノーザンプロット分析にて調べた。その結果を図10に記す。

【0057】ラット造血器型プロスタグランジンD合成酵素mRNAは脾臓、胸腺、骨髄、リノベ管、小腸、卵管に強く発現しているのに対し、ヒトでは胎盤、肺、心臓、胎児肝臓、リンパ節、脾臓、胸腺、骨髄、及び盲腸に強い発現が認められた。

【0058】末梢組織におけるプロスタグランジンD₂産生に関わる本酵素の遺伝子が単離されたことで今後遺伝子レベルで免疫アレルギー反応でのプロスタグランジンD₂産生の調節機構が解析できるようになった。

50 【0059】

【発明の効果】本発明により、末梢組織におけるプロスタグランジンD₂産生に関わるヒト造血器型PGD合成酵素の遺伝子が単離され、今後遺伝子レベルで免疫アレルギー反応でのプロスタグランジンD₂産生の調節機構が解析できるようになった。

【0060】プロスタグランジンD₂は血管拡張、気管支収縮、睡眠誘発などの作用をもつ生理活性物質であり、抹消組織でのプロスタグランジンD₂産生は造血器型PGD合成酵素によって行われる。気管支喘息などのアレルギー疾患や肥満細胞增多症における種々の症状はプロスタグランジンD₂が大きく関わっており、その治療法のひとつとして造血器型PGD合成酵素の阻害剤はそれらの治療薬となる。本発明によりプロスタグランジンD₂およびその代謝産物の関与する疾患の治療薬が開発できる。さらに本発明により造血器型PGD合成酵素を特異的に認識する抗体を作成することができるので、骨髄液中の造血器型PGD合成酵素を定量または染色し、肥満細胞腫ほか種々の白血病の診断キットおよび治*

配列：

```

GAATTGCACC ATGCCAAACT ACAAACTCAC TTA
TTTTAAT ATGAGGGGGA GAGCAGAAAT 60
TATTCGTTAC ATATTTGCTT ATTGGACAT ACA
GTATGAA GACCACAGAA TAGAACAAAGC 120
TGACTGGCT CAAATCAAAAT CAACTCTCCC ATT
TGGAAAA ATCCCCATTG 180
TGGACTTACT CTTCACCAAGA GCCTAGCAAT AGC
AAGATAT TTGACCAAAA ACACAGATTT 240
GGCTGGAAAC ACAGAAATGG AACAAATGTCA TGT
TGATGCT ATTGTGGACA CTCTGGATGA 300
TTTCATGTCA TGTTTCCCTT GGGCAGAGAA AAA
GCAAGAT GTGAAAGAGC AGATGTTCAA 360
TGAGCTGCTC ACGTATAATG CGCCTCATCT TAT
GCAAGAC TTGGACACAT ATTTAGGGGG 420
GAGAGAAATGG CTTATTGGTA ACTCTGTAAAC TTG
GGCAGAC TTCTACTGGG AGATTTGCAG 480
TACCAACACTT TTGGTCTTTA AGCCTGACCT GTT
AGACAAAC CATCCAAGGC TGGTGACTTT 540
ACGGAAGAAA GTCCAAGCCA TTCCCTGCCGT CGC
TAACTGG ATAAAACGAA GGCCCCAAAC 600
CAAACCTCTAG CTGATCCATG TTGCCTTCAA GTT
TGTGTTT CTCGGGGGCA TCTCTCTCAT 660
CAGATAAGAC AGCTACAGCA GCCIGCCAGA 720
TCCACAT GCTCCCTCCC CAGCTCCACT
AAGATTTCA CTTAGCCAT ATTCTGATTT TTA
AAAAGGA AAATAAAAC AAATCTTCT 780
TCAGT

```

785

【0062】配列番号：2

配列の長さ：199

配列：

*配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

15 16

Met Pro Asn Tyr Lys Leu Thr Tyr Phe Asn Met Arg Gly Arg Ala Glu
 1 5 10 15
 Ile Ile Arg Tyr Ile Phe Ala Tyr Leu Asp Ile Gln Tyr Glu Asp His
 20 25 30
 Arg Ile Glu Gln Ala Asp Trp Pro Glu Ile Lys Ser Thr Leu Pro Phe
 35 40 45
 Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Val Asp Gly Leu Thr Leu His Gln Ser
 50 55 60
 Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Leu Thr Lys Asn Thr Asp Leu Ala Gly Asn
 65 70 75 80
 Thr Glu Met Glu Gln Cys His Val Asp Ala Ile Val Asp Thr Leu Asp
 85 90 95
 Asp Phe Met Ser Cys Phe Pro Trp Ala Glu Lys Gln Asp Val Lys
 100 105 110
 Glu Gln Met Phe Asn Glu Leu Leu Thr Tyr Asn Ala Pro His Leu Met
 115 120 125
 Gln Asp Leu Asp Thr Tyr Leu Gly Arg Glu Trp Leu Ile Gly Asn
 130 135 140
 Ser Val Thr Trp Ala Asp Phe Tyr Trp Glu Ile Cys Ser Thr Thr Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Phe Lys Pro Asp Leu Leu Asp Asn His Pro Arg Leu Val Thr
 165 170 175
 Leu Arg Lys Lys Val Gln Ala Ile Pro Ala Val Ala Asn Trp Ile Lys
 180 185 190
 Arg Arg Pro Gln Thr Lys Leu
 195

【0063】配列番号：3

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列：

Ile Lys Pro Thr Leu Pro Phe Gly Lys

* 1 5

【0064】配列番号：4

配列の長さ：35

30 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

【0065】配列番号：5

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列：

TT1CCRAAIG G1AR1G1GG TTT

23

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※

【0066】配列番号：6

配列の長さ：134

配列の型：核酸

配列：

CTGCTGTACT TCAACATGCG GGGGAGGGCG GAAATTATTC GTTATATATT TGCTTATTG 60
GACATCAAGT ACGAAGATCA CAGAATAGAA CAAGCTGACT GGCCTAAAAT CAAACCCACC 120
CTCCCCCTCG GCAA 134

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★

【0067】配列番号：7

配列の長さ：44

配列：

Leu Leu Tyr Phe Asn Met Arg Gly A50 Ala Glu Ile Ile Arg Tyr Ile

☆配列の型：アミノ酸

☆ トポロジー：直鎖状

(10)

1	5	10	15												
Phe	Ala	Tyr	Leu	Asp	Ile	Lys	Tyr	Glu	Asp	His	Arg	Ile	Glu	Gln	Ala
20															
Asp	Trp	Pro	Lys	Ile	Lys	Pro	Thr	Leu	Pro	Phe	Gly				
35															
40															

【0068】配列番号：8

配列の長さ：22

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

*

配列：

TAGGCCAGTC AGCTTGTCT AT 22

【0069】配列番号：9

配列の長さ：22

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※

配列：

ATAGAACAAAG CTGACTGGCC TA 22

【0070】配列番号：10

配列の長さ：1004

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★

配列：

CAGAGCTCCT TCCAGGCTGA ACTTTGGACG TGT
 GTATCTC GTGTGAGCAA TGCAGGAAGG 60
 CTTTTAGGTG GAGGAAGTGG GCTCTGGCTG TCT
 TGTGACT ATCACTCCCT CATCACAGAA 120
 GCCACAGTAC AGATAGGAAC GGAGACACAG AGA
 CACAGCA CAGCGAAGGG ACTCTCGGCA 180
 TAGAACTGTA CCATGCCCAA CTACAAACTG CTT
 TATTTTA ATATGAGGGG AAGAGCAGAA 240
 ATTATTGTT ATATATTGC TTATTGGAC ATC
 AAGTACG AAGATCACAG AATAGAACAA 300
 GCTGACTGGC CTAAATCAA ACCAACTCTT CCA
 TTTGGCA AAATCCCTGT TTTGGAGGTG 360
 GAAGGACTTA CACTCACCA GAGCCTCGCA ATA
 GCAAGAT ATTGACCAA AAACACAGAT 420
 TTGGCTGGGA AGACAGAGCT GGAGCAGTGT CAA
 GTGGATG CAGTGGTGG A TACCCCTGGAC 480
 GATTTCATGT CACTCTTCC ATGGGCAGAG GAA
 AATCAAG ATCTAAAAGA GCGGACGTTC 540
 AATGACTTGC TCACACGTCA AGCACCTCAT CTT
 CTGAAAG ATTTGGACAC ATACTTAGGA 600
 GACAAAGAGT GGTTTATTGG CAATTATGTA ACT
 TGGGCAG ATTTCTATTG GGATAICTGC 660
 AGCACCAACAC TTTTGGTCTT AAAGCCCGAC CTG
 TTGGGCA TCTACCCAG ACTGGTGTCA 720
 CTACGGAACA AAGTCCAAGC TATTCCTGCT ATT
 TCTGCCT GGATCCTAAA GAGGCCACAG 780
 ACAAAACTCT AAATGATTCT GGACCCATCA TCA
 GATGAGA AGTCCATCAG CCGGCTACAG 840
 CATCTGCAA CTTCTCGCCA CCACTAGGCC TTC
 CTCTCAC TTTGTAGTA⁵⁰ TGTGCTTGCT 900

19

20

GTGTAGGATT CCTTTGTTGT GACTTTGTCT TTT
 TCTGTAG GCATTTAGTT TCCAATATT 960
 TTTCAAAACT TCACACGTT TATAATTACA GGG
 AAATAGT TCAC 1004

【0071】配列番号：11

*配列の型：アミノ酸

配列の長さ：199

*トポロジー：直鎖状

配列：

Met Pro Asn Tyr Lys Leu Leu Tyr Phe Asn Met Arg Gly Arg Ala Glu
 1 5 10 15
 Ile Ile Arg Tyr Ile Phe Ala Tyr Leu Asp Ile Lys Tyr Glu Asp His
 20 25 30
 Arg Ile Glu Gln Ala Asp Trp Pro Lys Ile Lys Pro Thr Leu Pro Phe
 35 40 45
 Gly Lys Ile Pro Val Leu Glu Val Gly Leu Thr Leu His Gln Ser
 50 55 60
 Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Leu Thr Lys Asn Thr Asp Leu Ala Gly Lys
 65 70 75 80
 Thr Glu Leu Glu Gln Cys Gln Val Asp Ala Val Val Asp Thr Leu Asp
 85 90 95
 Asp Phe Met Ser Leu Phe Pro Trp Ala Glu Glu Asn Gln Asp Leu Lys
 100 105 110
 Glu Arg Thr Phe Asn Asp Leu Leu Thr Arg Gln Ala Pro His Leu Leu
 115 120 125
 Lys Asp Leu Asp Thr Tyr Leu Gly Asp Lys Glu Trp Phe Ile Gly Asn
 130 135 140
 Tyr Val Thr Trp Ala Asp Phe Tyr Trp Asp Ile Cys Ser Thr Thr Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Leu Lys Pro Asp Leu Leu Gly Ile Tyr Pro Arg Leu Val Ser
 165 170 175
 Leu Arg Asn Lys Val Gln Ala Ile Pro Ala Ile Ser Ala Trp Ile Leu
 180 185 190
 Lys Arg Pro Gln Thr Lys Leu
 195

【0072】配列番号：12

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：409

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※

配列：

CAGAGCTCCT TCCAGGCTGA ACTTTGGACG TGTGTATCTC GTGTGAGCAA TGCAGGAAGG 60
 CTTTTAGGTG GAGGAAGTGG GCTCTGGCTG TCTTGTGACT ATCACTCGCT CATCACAGAA 120
 GCCACAGTAC AGATAGGAAC GGAGACACAG AGACACAGCA CAGCGAAGGG ACTCTCGGCA 180
 TAGAACTGTA CCATGCCAA CTACAAACTG CTTTATTTA ATATGAGGGG AAGAGCAGAA 240
 ATTATTGCTT ATATATTGTC TTATTGGAC ATCAAGTACG AAGATCACAG AATAGAACAA 300
 GCTGACTGGC CTAAATCAA ACCAACTCTT CCATTTGGCA AAATCCCTGT TTTGGAGGTG 360
 GAAGGACTTA CACTTCACCA GAGCCTCGCA ATAGCAAGAT ATTTGACCA 409

【0073】配列番号：13

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：406

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★

配列：

CATGATCTGA TTTCAACCAA GTTCCCCGT ATGTAATTAG ATAGTGATT ATAATTTGG 60
 TTTTGAATA TCCTCTAATG TCTCCAGTAA TGTCAAGAGA TGCCATAAAG TTTTCCAAA 120

22
180
240
300
360
406

AATTCTGAAG AAAATATTG AGGCATCTCT AGAGGGCTCT TAAAATAATC CCTCCCTTT
TCTTTCCA GAATTGCACC ATGCCAAACT ACAAACTCAC TTATTTAAT ATGAGGGGA
GAGCAGAAAT TATTCGTTAC ATATTTGCTT ATTTGGACAT ACAGTATGAA GACCACAGAA
TAGAACAAAGC TGACTGGCCT GAAATCAAAT CAAGTAAGT GCACAAATAA TAAATGTAGG
AAAATATGCT TTCAGAACCT TTTGTTTTC CTCAGGGAT GAAAAA

【0074】配列番号：14

*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

*

配列：

GAATTGCACC ATGCCAAACT

20

【0075】配列番号：15

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※

配列：

AGTTGGCAT GGTGCAATT

20

【0076】配列番号：16

★配列の型：アミノ酸

配列の長さ：199

★トポロジー：直鎖状

配列：

Met Pro Asn Tyr Lys Leu Leu Tyr Phe Asn Met Arg Gly Arg Ala Glu
1 5 10 15
Ile Ile Arg Tyr Ile Phe Ala Tyr Leu Asp Ile Lys Tyr Glu Asp His
20 25 30
Arg Ile Glu Gln Ala Asp Trp Pro Lys Ile Lys Pro Thr Leu Pro Phe
35 40 45
Gly Lys Ile Pro Val Leu Glu Val Glu Gly Leu Thr Ile His Gln Ser
50 55 60
Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Leu Thr Lys Asn Thr Asp Leu Ala Gly Lys
65 70 75 80
Thr Ala Leu Glu Gln Cys Gln Ala Asp Ala Val Val Asp Thr Leu Asp
85 90 95
Asp Phe Met Ser Leu Phe Pro Trp Ala Glu Lys Asp Gln Asp Leu Lys
100 105 110
Glu Arg Met Phe Asn Glu Leu Leu Thr His Gln Ala Pro Arg Leu Leu
115 120 125
Lys Asp Leu Asp Thr Tyr Leu Gly Asp Lys Glu Trp Phe Ile Gly Asn
130 135 140
Tyr Val Thr Trp Ala Asp Phe Tyr Trp Asp Ile Cys Ser Thr Thr Leu
145 150 155 160
Leu Val Leu Lys Pro Gly Leu Leu Asp Ile Tyr Pro Lys Leu Val Ser
165 170 175
Leu Arg Asn Lys Val Gln Ala Ile Pro Ala Ile Ser Ala Trp Ile Leu
180 185 190
Lys Arg Pro Gln Thr Lys Leu
195

★配列の型：アミノ酸

【0077】配列番号：17

★トポロジー：直鎖状

配列の長さ：203

配列：

Lys Asn Thr Tyr Thr Leu Phe Tyr Phe Asn Val Lys Ala Leu Ala Glu
1 5 10 15
Pro Leu Arg Tyr Leu Phe Ala Tyr GFO Gly Ile Glu Tyr Glu Asp Val

23 20 25 30 24

Arg Val Thr Arg Asp Glu Trp Pro Ala Leu Lys Pro Thr Met Pro Met
 35 40 45
 Gly Gln Met Pro Val Leu Glu Val Asn Gly Lys Arg Val His Gln Ser
 50 55 60
 Ile Ser Met Ala Arg Phe Leu Ala Lys Thr Val Gly Leu Cys Gly Ala
 65 70 75 80
 Thr Pro Trp Glu Asp Leu Gln Val Asp Ile Val Val Asp Thr Ile Asn
 85 90 95
 Asp Phe Arg Leu Lys Ile Ala Val Val Ser Tyr Glu Pro Glu Asp Glu
 100 105 110
 Ile Lys Glu Lys Leu Val Thr Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Phe
 115 120 125
 Tyr Leu Glu Lys Leu Glu Gln Thr Val Lys Asp Asn Asp Gly His Leu
 130 135 140
 Ala Leu Asn Lys Leu Thr Trp Ala Asp Val Tyr Phe Ala Gly Ile Leu
 145 150 155 160
 Asp Tyr Met Asn Tyr Met Val Lys Arg Asp Ile Leu Glu Gln Tyr Pro
 165 170 175
 Ala Leu Arg Gly Val Val Asp Ser Val Asn Ala Leu Glu Pro Ile Lys
 180 185 190
 Ala Trp Ile Glu Lys Arg Pro Gln Thr Glu Val
 195 200

【0078】配列番号：18

配列の長さ：206

*配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列：

Met Pro Gln Tyr Lys Leu Thr Tyr Phe Asp Ile Arg Gly Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Leu Ile Phe His Gln Ala Gly Val Lys Phe Glu Asp Asn
 20 25 30
 Arg Leu Lys Arg Glu Asp Trp Pro Ala Leu Lys Pro Lys Thr Pro Phe
 35 40 45
 Gly Gln Leu Pro Leu Leu Glu Val Asp Gly Glu Val Leu Ala Gln Ser
 50 55 60
 Ala Ala Ile Tyr Arg Tyr Leu Gly Arg Gln Phe Gly Leu Ala Gly Lys
 65 70 75 80
 Thr Pro Met Glu Glu Ala Gln Val Asp Ser Ile Phe Asp Gln Phe Lys
 85 90 95
 Asp Phe Met Ala Glu Leu Arg Pro Cys Phe Arg Val Leu Ala Gly Phe
 100 105 110
 Glu Glu Gly Asp Lys Glu Lys Val Leu Lys Glu Val Ala Val Pro Ala
 115 120 125
 Arg Asp Lys His Leu Pro Leu Leu Glu Lys Phe Leu Ala Lys Ser Gly
 130 135 140
 Ser Glu Tyr Met Val Gly Lys Ser Val Thr Trp Ala Asp Leu Val Ile
 145 150 155 160
 Thr Asp Ser Leu Ala Ser Trp Glu Ser Leu Ile Pro Asp Phe Leu Ser
 165 170 175
 Gly His Leu Gln Leu Lys Lys Tyr Ile Glu His Val Arg Glu Leu Pro
 180 185 190

Asn Ile Lys Lys Trp Ile Ala Glu Arg Pro Lys Thr Pro Tyr
195 200 205

【0079】配列番号：19
配列の長さ：208

* 配列の型：アミノ酸
* トポロジー：直鎖状

配列：

Met Val His Tyr Lys Leu Thr Tyr Phe Leu Ser Arg Gly Leu Gly Asp
1 5 10 15
Val Ser Arg Gln Leu Phe His Leu Ala Asp Val Asp Phe Glu Asp Glu
20 25 30
Arg Leu Glu Lys Pro His Phe Leu Glu Lys Glu Thr Tyr Pro Phe
35 40 45
Lys Gln Val Pro Val Leu Ser Val Asp Gly Phe Gln Ile Pro Gln Ser
50 55 60
Met Ala Ile Ala Arg Tyr Leu Ala Lys Phe Gly Phe Ala Gly Lys
65 70 75 80
Thr Ala Glu Glu Ser Ala Met Val Asp Ala Phe Val Asp Gln Phe Lys
85 90 95
Asp Phe Tyr Ser Glu Ile Arg Asp Tyr Tyr Tyr Thr Met Leu Gly Leu
100 105 110
Gly Leu Thr Asp Leu Asp Gly Asp Glu Gln Lys Asp Lys Val Leu Ile
115 120 125
Pro Ala Arg Asp Lys Phe Leu Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Glu Lys
130 135 140
Ser Iys Ser Gly Phe Leu Val Asp Gly Leu Thr Phe Ala Asp Leu
145 150 155 160
Ile Ile Leu Asp Asn Met Thr Ser Leu Leu Asn Trp Trp Pro Glu Tyr
165 170 175
Ala Asn Asp Tyr Pro Val Ile Leu Ala Trp Arg Asp Lys Val Met Asn
180 185 190
Tyr Pro Arg Leu Lys Glu Tyr Ile Glu Lys Arg Pro Val Thr Met Tyr
195 200 205
※ 配列の型：アミノ酸
※ トポロジー：直鎖状

【0080】配列番号：20

配列の長さ：221

配列：

Ala Glu Lys Pro Lys Leu His Tyr Phe Asn Ala Arg Gly Arg Met Glu
1 5 10 15
Ser Thr Arg Trp Leu Leu Ala Ala Ala Gly Val Glu Phe Glu Glu Lys
20 25 30
Phe Ile Lys Ser Ala Glu Asp Leu Asp Lys Leu Arg Asn Asp Gly Tyr
35 40 45
Leu Met Phe Gln Gln Val Pro Met Val Glu Ile Asp Gly Met Lys Leu
50 55 60
Val Gln Thr Arg Ala Ile Leu Asn Tyr Ile Ala Ser Lys Tyr Asn Leu
65 70 75 80
Tyr Gly Lys Asp Ile Lys Glu Arg Ala Leu Ile Asp Met Tyr Ile Glu
85 90 95
Gly Ile Ala Asp Leu Gly Glu Met Ile Leu Leu Pro Val Cys Pro
100 105 110
Pro Glu Glu Lys Asp Ala Lys Leu Ala Leu Ile Lys Glu Lys Ile Lys
115 120 125
130 135 140
145 150 155
160 165 170
175 180 185
190 195 200
205 210 215
220 221

27
 Asn Arg Tyr Phe Pro Ala Phe Glu Lys Val Leu Lys Ser His Gly Gln
 130 135 140
 Asp Tyr Leu Val Gly Asn Lys Leu Ser Arg Ala Asp Ile His Leu Val
 145 150 155 160
 Glu Leu Leu Tyr Tyr Val Glu Glu Leu Asp Ser Ser Leu Ile Ser Ser
 165 170 175
 Phe Pro Leu Leu Lys Ala Leu Lys Thr Arg Ile Ser Asn Leu Pro Thr
 180 185 190
 Val Lys Lys Phe Leu Gln Pro Gly Ser Pro Arg Lys Pro Pro Met Asp
 195 200 205
 Glu Lys Ser Leu Glu Glu Ala Arg Lys Ile Phe Arg Phe
 210 215 220

* 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状

【0081】配列番号：21

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

TGCCATATGC CAAACTACAA A

21

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

【0082】配列番号：22

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列：

TGGAATTCT AGAGTTGGT TTG

23

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

【0083】配列番号：23

配列の長さ：959

配列の型：核酸

★

配列：

CTTTATGCAA ATACGTTGGA CTAATGTTAGA GAG
 CTTGTGA AATGATGACA AAAGCTACCC 60AGA
 GCTCTTT ACAGGCTGAA CTTTGGACTC GTGCAT
 CTCA TGTGAGAAAG GCAGGAAGGC 120TTTTAG
 GTGG AGGAAGTGGC CTCTGGCTGT CTTGTGACT
 G CCACATCATCA CAGAAACAC 180TGTACAGAC
 A GGAAGTGAGA CACGGAGACA CGGCACAGGA A
 AGGCTCTCT GCATAGAATT 240GTACCATGCC T
 AACTACAAA CTGCTTTATT TTAATATGAG GGGAA
 AGAGCC GAAATTATTC 300
 GCTACATATT CGCTTAITTG GACATAAAGT ATG
 AGGATCA CAGAATAGAA CAAGCTGACT 360
 GGCCTAAAAT CAAGCCAAGT CTTCCATTTG GCA
 AAATCCC TGTTTGGAG GTGGAAGGAC 420
 TTACAATCCA CCAGAGCCTC GCAATAGCAA GAT
 ATTTGAC CAAAAACACA GATTGGCTG 480
 GGAAGACAGC GTTGGAGCAA TGTCAAGCTG ATG
 CAGTGGT GGACACGCTG GATGACTTCA 540
 TGTCTCTCTT CCCATGGGCA GAGAAAGATC AAG
 ATCTAAA AGAGCGGATG TTCAATGAAT 600
 TGCTCACACA TCAAGCACCT CGCCTTCTGA AAG
 ATTTGGA CACATACTTA GGAGACAAAG 660
 AGTGGTTTAT AGGCAATTAT GTAACCTGGG CAG
 ACTTCTA CTGGGATA¹⁵⁰ TGCAGCACCA 720

CACTTTGGT TTTAAAGCCT GGCTTGTGG ATA
TCTACCC CAAACTGGTG TCATTACGGA 780
ACAAAGTCCA AGCTATCCCT GCCATTCTG

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト造血器型PGD合成酵素のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の模式図。

【図2】PCR後(134bp)のcDNA断片のヌクレオチド配列および予想アミノ酸配列の模式図。

【図3】ラットPGD合成酵素cDNAのヌクレオチド配列と予想アミノ酸配列の模式図。

【図4】ヒトPGD合成酵素染色体遺伝子のエクソン部分とラットPGD合成酵素cDNAのヌクレオチド配列の比較図表。

【図5】ヒト造血器型PGD合成酵素の大腸菌内発現プラスマドの構築過程を示す模式図。

【図6】ヒト造血器型PGD合成酵素の発現形質転換*

* 体の可溶性画分と精製酵素のSDS電気泳動写真。

【図7】ヒト、マウスおよびラットの造血器型PGD合成酵素のアミノ酸配列比較図表。

【図8】ヒト造血器型PGD合成酵素と他のグルタチオン転移酵素の配列比較図表。

【図9】グルタチオン転移酵素遺伝子ファミリーの進化系統樹を示す図表。

【図10】ヒトの臓器の造血器型プロスタグラジンD合成酵素cDNAを用いたノーザンプロットの電気泳動写真。

【図11】マウスのcDNAのヌクレオチド配列およびその予想アミノ酸配列の模式図。

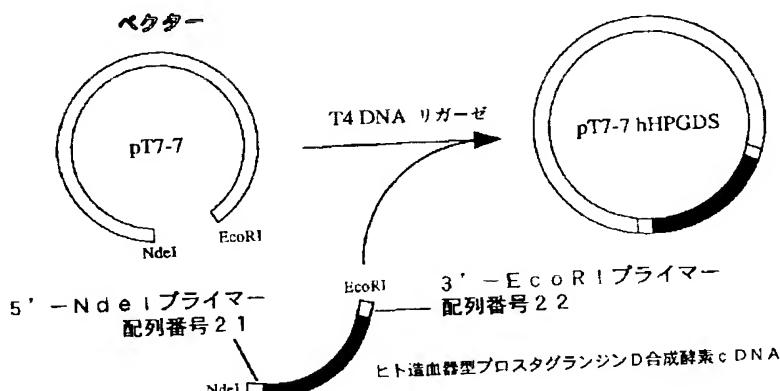
【図2】

10	20	30	40	50	60
CTGCTGTACTTCAACATGCGGGGAGGGCGGAAATTATTCGTTATATATTGCTTATTG					
L	L	Y	F	N	M
R	G	R	A	E	I
I	R	Y	I	F	A
Y	L				

70	80	90	100	110	120
GACATCAACTACGAAGATCACAGAATAGAACAGCTGACTGGCCTAAATCAAACCCACC					
D	I	K	Y	E	D
H	R	I	E	Q	A
W	P	K	I	K	P
					T

130				
CTCCCCCTTCGGCAA				
L	P	F	G	

【図5】



PCRによって得られたDNA断片

pT7-7 hPGDS作製法の模式図

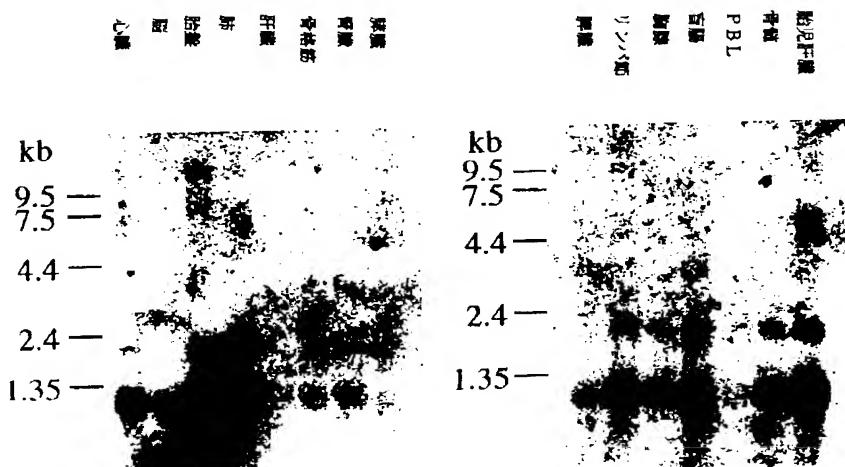
【図1】

1	GAATTGCACCATGCCAAACTACAAACTCACTTATTTAATATGAGGGGGAGAGCAGAAAT 1	60
	M P N Y K L T Y F N M R G R A E I	17
61	TATTCGTTACATATTCGTTATGGACATACAGTATGAAGACCACAGAAATAGAACAGC 18 I R Y I F A Y L D I Q Y E D H R I E Q A	120 37
121	TGACTGGCTGAAATCAAATCAACTCTCCCATTGGAAAAATCCCATTGGAGTTGA 38 D W P E I K S T L P F G K I P I L E V D	180 57
181	TGGACTTACTCTCACCAAGACCCTAGCAATAGCAAGATATTGACCAAAAACAGATT 58 G L T L H Q S L A I A R Y L T K N T D L	240 77
241	GGCTGGAAACACAGAAATGGAACAATGTCATGTTGATGCTATTGACACTCTGGATGA 78 A G N T E M E Q C H V D A I V D T L D D	300 97
301	TTTCATGTCATGTTCTTGGCAGAGAAAAAGCAAGATGCAAGAGACAGATGTTCAA 98 F M S C F P W A E K K Q D V K E Q M F N	360 117
361	TGAGCTGTCACGTATAATGCGCCTCATCTTATGCAAGACTTGGACACATATTAGGGGG 118 E L L T Y N A P H L M Q D L D T Y L G G	420 137
421	GAGAGAATGGCTTATTGTAACCTGTAACCTGGCAGACTCTACTGGGAGATTGCAAG 138 R E W L I G N S V T W A D F Y W E I C S	480 157
481	TACCAACTTTGGCTTAAAGCCTGACCTGTTAGACAACCATCCAAGGCTGGTGCAC 158 T T L L V F K P D L L D N H P R L V T L	540 177
541	ACGGAAAGAAAGTCCAAGCCATTCCCTGCCGTCGCTAACTGGATAAAACGAAGGCCAAC 178 R K K V Q A I P A V A N W I K R R P Q T	600 197
601	CAAACCTCTAGCTGATCCATGTTGCCTCAAGTTGTTCTCGGGGCATCTCTCAT 198 K L *	660 199
661	CAGATAAGACAGCTACATCAGCCTGCCAGATAATCCACATGCTCCCTCCCCAGCTCCACT	720
721	AAGATTTCACTTAGCCATATTCTGATTTAAAAAGGAAAATAAAAACAAATCTTCT	780
781	TCAGTAAAAAAAAAA	798

【図3】

1	CAGAGCTCCTTCCAGGCTGAACTTGGACGTGTATCTCGTGTGAGCAATGCAGGAAGG	60
61	CTTTAGGTGGAGGAAGTGGGCTCTGGCTGTCTGTCACTATCACTCGCTCATCACAGAA	120
121	GCCACAGTACAGATAGGAACGGAGACACAGAGACACAGCACAGCAAGGGACTCTCCGA	180
181	TAGAACTGTACCATGCCCAACTACAAACTGCTTATTTAAATGAGGGAAAGAGCAGAA	240
1	M P N Y K L L Y F N M R G R A E	16
241	ATTATTGTTATATATTGCTTATTGGACATCAAGTACGAAGATCACAGAATAGAACAA	300
17	I I R Y I F A Y L D I K Y E D H R I E Q	36
301	GCTGACTGGCCTAAAATCAAACCAACTCTTCCATTGGCAAAATCCCTGTTGGAGGTG	360
37	A D W P K I K P T L P F G K I P V L E V	56
361	GAAGGACTTACACTTACCCAGAGCTCGCAATAGCAAGATATTGACCAAAAAACACAGAT	420
57	E G L T L H Q S L A I A R Y L T K N T D	76
421	TTGGCTGGGAAGACAGAGCTGGAGCAGTGTCAAGTGGATGCACTGGTGGATACCCCTGGAC	480
77	L A G K T E L E Q C Q V D A V V D T L D	96
481	GATTCATGTCACTCTTCCATGGCAGAGGAAAATCAAGATCTAAAGAGCGGACGTTTC	540
97	D F M S L F P W A E E N Q D L K E R T F	116
541	AATGACTTGGTCACACGTCAGCACCTCATCTCTGAAAGATTGGACACATACTTAGGA	600
117	N D L L T R Q A P H L L K D L D T Y L G	136
601	GACAAAGAGTGGTTATTGGCAATTATGTAACTTGGCAGATTCTATTGGGATATCTGC	660
137	D K E W F I G N Y V T W A D F Y W D I C	156
661	AGCACCCACACTTTGGTCTTAAAGCCCGACCTGTTGGCATCTACCCCCAGACTGGTGTCA	720
157	S T T L L V L K P D L L G I Y P R L V S	176
721	CTACGGAAACAAAGTCCAAGCTATTCTGTCTATTCTGCCTGGATCCTAAAGAGGCCACAG	780
177	L R N K V Q A I P A I S A W I L K R P Q	196
781	ACAAAAACTCTAAATGATTCTGGACCCATCATCAGATGAGAAGTCCATCAGCCGGCTACAG	840
197	T K L *	199
841	CATCTGCAAACCTCTGCCACCACCTAGGCCTTCCCTCTCACTTGTAGTATTGTCTTGCT	900
901	GTGTAGGATTCTTGTGACTTTGTCTTGTAGGCATTAGTTCATTTCAATATTT	960
961	TTTCAAAACTTCACACGTTATAATTACAGGGAAATAGTCACAAAAAAAAAAAAAA	1020

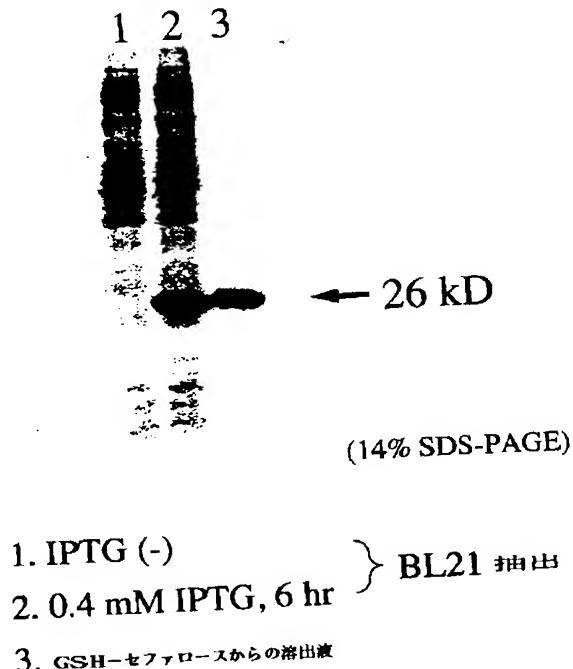
【図10】



【図4】

ラット PGDS cDNA	1'	CACAGCTCCCTCCAGGCTGAACCTGGACGTGTATCTCG--TGTGAGCAATGCCAGGA	57'
ラット PGDS cDNA	541"	CATGATCTGATTCA--ACCAAGTTCCCCGTATGTAAATTAGATGTATTAAATT-AATT	597"
ヒトゲノム			
ラット PGDS cDNA	58'	AGGCCTTTAGGTGGAGGAAGTGGCTCTGGCTGTCTTGTA-CTATCA-CTCGCTCATCA	115'
ラット PGDS cDNA	598"	TGGTTTTGAAATAATCCCTCATATGTCTCCAGTAATCTCAAGAGATGCCATAAAGTTTCCA	657"
ヒトゲノム			
ラット PGDS cDNA	116'	CAGAAGGCCACAGTACAGATAAGGAACGGAGACACAGA-GACAC----AGCACAGCGAAAGG	169'
ヒトゲノム	658"	AAAATTCTGAACAAAATATTGAGGCATCTCTAGAGGGCTCTAAATAATCCCTCCCT	717"
ヒトゲノム			
ラット PGDS cDNA	170'	GACTCTGGCATAGAACCTGTACCATGCCAACTACAAACTGCTTATTTAATATGAGGG	229'
ヒトゲノム	718"	TTTCTTTTCCAGAATTGCCACATGCCAAACTACAAACTCACTTATTTAATATGAGGG	777"
ヒトゲノム			
ラット PGDS cDNA	23C'	GAAGAGCAGAAATTATTGCTTATATATTGCTTATTGGACATCAAGTACAGAACATCACA	289'
ヒトゲノム	778"	GGAGAGCAGAAATTATTGCTTACATATTGCTTATTGGACATACAGTATGAAAGACACA	837"
ヒトゲノム			
ラット PGDS cDNA	290'	GAATAGAACAAAGCTGACTGGCTAAATCAAACCAACTCTCCATTGGCAAAATCCCTG	349'
ヒトゲノム	838"	GAATAGAACAAAGCTGACTGGCTGAAATCAAATCAAGTAAGTAGCACAAATAATAATGT	897"
ヒトゲノム			
ラット PGDS cDNA	350'	TTTGGAGGGAGGACTTACACTTCACCAAGGCCCTGGCAATAGCAAGATAATTGACCA	409'
ヒトゲノム	898"	AGGAAAATATGCTTCAAGAACCTTTGTTTCAGGGAAATGAAAAA	946"

【図6】



【図11】

CTTATGCAAATACGTTGGACTAATGTAGAGACTTGCAATGATGACAAAAGCTACCC	60
AGACCTCTTACACCGTGAACCTTGGCACTGCTGATCTCATGTGAGAAAGGAGGAAAGCC	120
TTTAAAGTGGAGGAAGTGGCTCTGGCTTCTGTGACTGCCACTCATCACAGAAACCCAC	180
TUTACAGACAGGAAGCTAGAGACAOGGAGACAOCCACAGGAAGGGCTCTGATAGAATT	240
GTACCATGCCAACTCAACATGCCCTTATTAAATATGAGGGGAGACCCGAATTATTC	300
MPNYKLLYFLNMRGAETIR	19
GCTACATATTGGCTTATTGGACATAAGTATGAGGATCACAGAATAGAACAACTGACT	360
YIFAYLDDIKYEDHRIEQADY	39
GGCTAAATCAACGCAACTCTTCCATTGGCAAMATOCCTGTTTGGACGCTGGAGGAC	420
PKIKPTLPPFGKIPVLEVEGL	59
TTACAACTACCCAGGGCTCGCAATAGCAACATATTGGCAAAACACAGATTGGCTG	480
TIHQS LAIARYLT KNTDLAG	79
GGAAAGACACCGCTGGCAATGTCAGCTGATGCACTGGTGCACACCCCTGATGACTCA	540
X T A L E Q C Q A D A V V D T L D D F K	99
TGTCCTCTTCCCATGGCGAGAGAAAGATCTAAAGCTAAAGACCGGATGTCATGAAAT	600
SLFPPEAEKDQDLKERKPFKEL	119
TGCTCACACATCACCCACCTCGCTTCTGAAAGATTGGACACATACTGGAGACAAAG	660
LTHQAPRLLKDLDTYLGDKB	139
AGTCCTTATGCCAATTATGTAACCTGGCAGACTCTACTGGGATATCTGCAAGCCAA	720
YFIGHNYVTTWADPYWDICSTI	159
CACTTTGGCTTAAAGCCTGGCTTGGATATCTACCCAAACTGGCTCATACCGGA	780
LLVYLPGLLDIYPKLVSLRN	179
ACAAAGTCAACCTACCCCTGCAATTCTGCTGGGATCTAAACACCCACAGACAAAC	840
EVQATPAISAIIILKRPQTKL	199
TCTAGATGAATCAGGACCCATCATCAGATGAGAAGCTTACCTGGCTAGAGGATCCAC	900
ATACTCTCACCAGTAGGACTGTAACCTTGACTCTGCTGCTGCTGAGGATCTC	959

【図7】

ヒト	PGDS	1	-----T-----Q-----E--S-----I---D-----	67
マウス	PGDS	1	-----E-----I-----I-----I-----	67
ラット	PGDS	1	MPNYKLLYFNMRGRAEIIIRYIFAYLDIKYEDHRIEQADWPKRKPTLPPFGKIPVLEVEGLLHQSLAI *****	67
ヒト	PGDS	68	-----N---M---H---I-----C-----KK---V---QM---E---YN---MQ-----	134
マウス	PGDS	68	-----A-----A-----KD-----M---E---H---R-----	134
ラット	PGDS	68	ARYLTKNTDLACKTELEQCQVDAVDTLDDEMSLFPWAENQDLKERTENDLLTRQAFHLKLDDTY *****	134
ヒト	PGDS	135	--GR--L---S-----E-----F-----DNH---T--K-----VAN--KR-----	199
マウス	PGDS	135	-----G--D-----	199
ラット	PGDS	135	LGDKEWFIGNYVTWADFYWDICSTTLLVKPDLLIGIYPRLVSLRNKVOAIPAIISAWILKRPQTKL *****	199

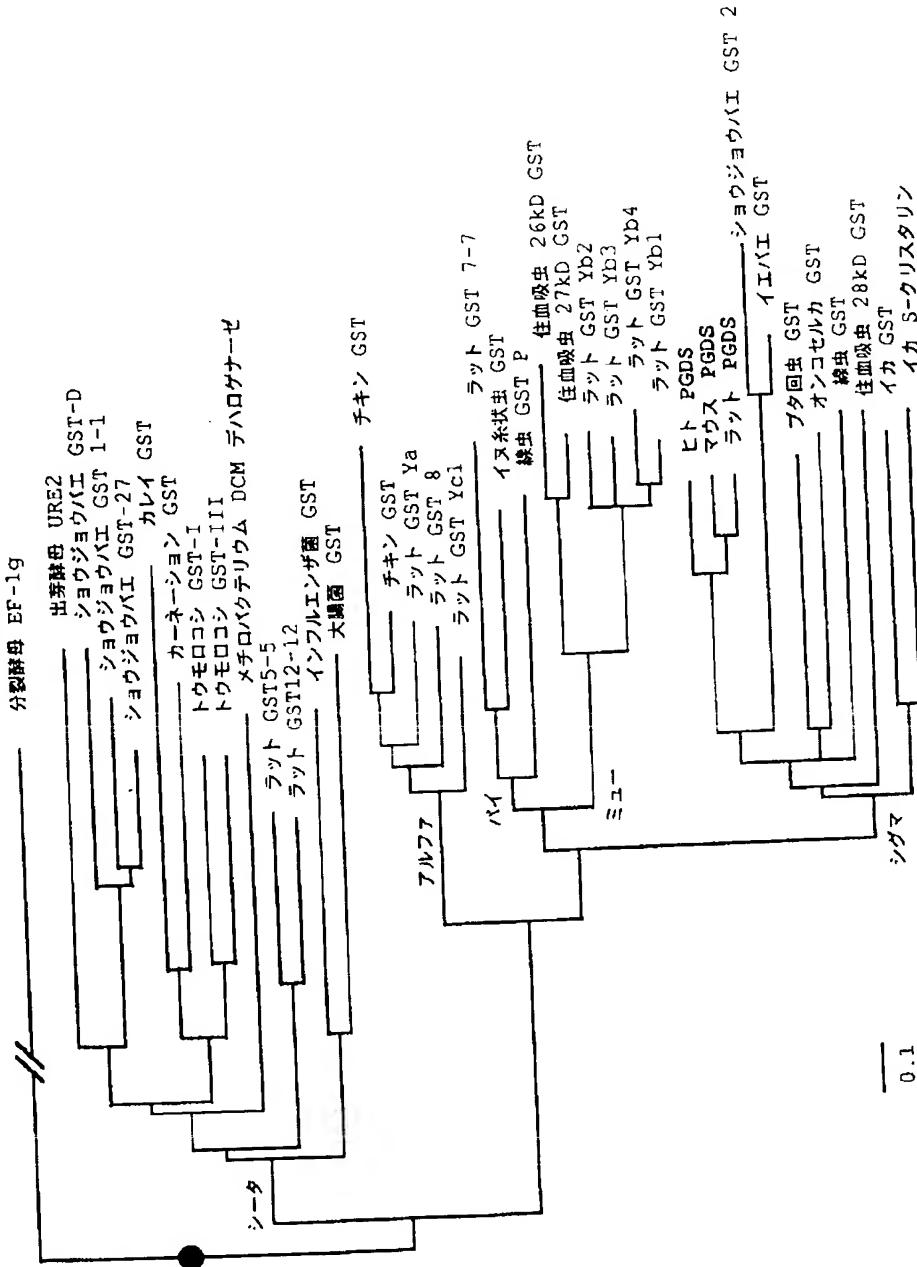
[図8]

ヒト PGDS MPNYKLTYFNMRGAEIIRYIPIAYLDIQYEDHRIEQ-----ADNPPIKST--LPFGKIPFILEVDGLTLHQSSLAIAARYLTNTDLAGK
 ラット PGDS MPNYKLLYFNMRGAEIIRYIPIAYLDIKYEDHRIEQ-----ADNPPIKPT--LPFGKIPVLEVEGLT--LHQSSLAIAARYLTNTDLAGK
 マウス PGDS MPNYKLLYFNMRGAEIIRYIPIAYLDIKYEDHRIEQ-----ADNPPIKPT--LPFGKIPVLEVEGLTIHQSIAIAARYLTNTDLAGK
 ハエ GST KNTYTLTYFNVKALAELPRLYFAYGGIEYEDVVRTR-----DENPAKPT--MPMGOMPVLVEGKRVHQSIISMARFLAKTVGLCGA
 回虫 GST MPOYKLTYFDIRGLGEARLIFHOGYKFEDNRNLR-----EDWPAKPK--TPFGOLPILLEVDGEVLAQSSAIYRYLGQFCLAGK
 ニホンズズムシ GST MHYKLTYFLSRGFLGDSRQLFHADYDFEDERLEK-----PHFLEXKET--YPPKQVPVLSVDFQIPOSMAIARYLAKKFSGAK
 ヒト アルファ GST AEKPKLHYFNAGRMESTRWLLAAAGVETEEFKIKS-----AEDLDKLRNNDGYLMFQQVEMVYEDGMKLVQTRAILNYIASKYNLYGK

PGDS TEMEQCHVDAIVDTLDDEMSCP--WAEK-----
PGDS TELEQCQDVDAVDTLDDEMSLFP--WAE-----
PGDS TALEQQCQADAVVDTLDDEMSLFP--WAE-----
PGDS TPWEDLQDVDDIVDTINDFRKLIAWSSYEP-----
GST TP'MEEAQDVDSIFQFKDMEAELRCPFRVLAGF-----
GST TAEESAMVDAFUDQFKDYESEIRDYTTMGLGLTDLDGDEQDKVL-----
GST DIKERALLIMYIEGIAADLGEMILLVCP-----
* PGDS KQDVKEQMFNELLTYNAPHLMQDLDTYLGLR-----
PGDS -EWEIIGNYVNTWADFYWDI-----
PGDS -NQDLIKERTFDNLTRQAPHLLKDLDTYLGLK-----
PGDS -DQDLIKERMFNEELLTHOAPRLLKLDLDTYLGLK-----
GST -DGCHLALNKLWTADWVYFLAG-----
GST -EDEIKERKKLVLTINNEVTFYLEKLEQTVKD-----
GST -GSEIYMGKSVTWTADLVL-----
GST -KSGFLVDGGLTADLIL-----
GST -GQDYLVGNKLRSRADILHVE-----
GST -PEEKDAKLILIKEKIKNRYFPFAFEKVLKSH-----
GST -

ヒト PGDS	CSTILLVF-KPDLIDNHPRLVTLRKVKQOAPAVANWIK	ヒト PGDS	CSTILLVL-KPDLIGIYPRLVSLRKVKQOAPASAWIL	ヒト PGDS	CSTILLVL-KPGLIDIPKLVSLRKVKQOAPASAWIL	ヒト PGDS	CSTILLVL-KPGLIDIPKLVSLRKVKQOAPASAWIL	ヒト PGDS	CSTILLVL-KPGLIDIPKLVSLRKVKQOAPASAWIL
ラット PGDS									
マウス PGDS		マウス PGDS		マウス PGDS		マウス PGDS		マウス PGDS	
人 GST	ILDYNNYMKRDLILEQYPAALRGYDVSNALEPIKAWIE								
回虫 GST	SLASWESLI-PDELSGHQLQKLYIEFWPEVTPNKKWIA								
綿虫 GST	NMTSLINWW-PEYANDYPVILAWRDKVWNPYRILKEYIE								
アルファ7 GST	LIYVVEEL-DSSLISSFFPLKKALKTRISNLPVTKKFLQ								

【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. "C 12 R 1:19)

識別記号 庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

(C 12 N 9/90

C 12 R 1:19)